

Nâng cao - tham khảo

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG MẮN CẢM KHÁNG SINH CỦA CÁC CHỦNG *HAEMOPHILUS PARASUIS* PHÂN LẬP TỪ THỰC ĐỊA Ở BRAZIL

Michela Miani¹, Monique S. Lorenson¹, João A. Guizzo¹, Julia P. Espíndola¹,
Elías F. Rodríguez-Ferri², César B. Gutiérrez-Matín², Luiz C. Kreutz¹, Rafael Frondoloso¹

TÓM TẮT

Haemophilus parasuis là tác nhân gây bệnh Glasser (GD), một bệnh nhiễm trùng phổ biến ở lợn với các biểu hiện đặc trưng là viêm màng bao có fibrin, viêm đa khớp và viêm màng não. Việc sử dụng nhiều loại kháng sinh trong chăn nuôi lợn những năm qua đã dẫn tới sự xuất hiện ngày càng nhiều các vi khuẩn gây bệnh có khả năng kháng kháng sinh. Do đó, xét nghiệm tính miễn cảm kháng sinh thường xuyên là rất quan trọng để đảm bảo hiệu quả điều trị của các loại kháng sinh khác nhau. Trong nghiên cứu này, 50 chủng vi khuẩn *Haemophilus parasuis* phân lập được từ các đàn lợn ở phía Nam Brazil được kiểm tra và phân tích về sự miễn cảm của chúng đối với các loại kháng sinh thường được sử dụng. Việc giám định các chủng này được thực hiện thông qua phản ứng ngưng kết hồng cầu gián tiếp kết hợp với phản ứng PCR đa môi.

Sự miễn cảm của từng chủng vi khuẩn được phân tích bằng phương pháp pha loãng 21 loại kháng sinh. Chúng tôi thấy rằng các chủng phân lập từ thực địa có tỷ lệ kháng cao với gentamycin, bacitracin, lincomycin và tiamulin, nhưng nhạy cảm với ampicillin, clindamycin, neomycin, penicillin, danofloxacin và enrofloxacin. Hơn nữa, một phân tích khác chỉ ra rằng enrofloxacin có hiệu quả trong điều trị bệnh do các chủng phân lập được gây ra, trừ serovar 1. Các kết quả thu được trong nghiên cứu này trước tiên chứng minh tính nhạy cảm của các chủng *H. parasuis* phân lập được ở Brazil đối với các kháng sinh được sử dụng rộng rãi trong chăn nuôi lợn và khẳng định sự cần thiết của việc kiểm tra hiệu quả của việc sử dụng kháng sinh để điều trị khi có dịch GD xảy ra. Ngoài ra, vì chỉ có 6 loại kháng sinh (28,6%) có khả năng tiêu diệt các chủng phân lập từ thực địa, nên việc giám sát liên tục tại các khu vực miễn cảm nên là mối quan tâm lớn đối với ngành chăn nuôi lợn.

Từ khóa: *Haemophilus parasuis*, MIC, miễn cảm kháng sinh, chủng phân lập, lợn.

I. GIỚI THIỆU

Haemophilus parasuis là một vi khuẩn cơ hội, thường gặp ở đường hô hấp trên của lợn; khi con vật gặp các điều kiện bất lợi, bị “stress”, vi khuẩn này có thể gây bệnh Glass (GD) (Costa Hurtado và Aragon, 2013). Bệnh truyền nhiễm phổ biến này xảy ra chủ yếu ở lợn con và được đặc trưng bởi hiện tượng viêm các màng bao có fibrin, viêm đa khớp và viêm màng não (Oliveira et al., 2001). Hiện nay đã xác định được 15 serotype *H. parasuis*, nhưng ngày càng có nhiều chủng phân lập được không xác định được serotype, cho thấy mức độ đa dạng

cao của nhóm vi khuẩn này (Rafiee và Blackall, 2000). Mặc dù đã có 4 loại vaccin thương mại và việc tiêm phòng được thực hiện trên diện rộng, nhưng dịch GD vẫn thường xuyên xảy ra trong những đàn đã được tiêm phòng, gây nên những tổn thất kinh tế lớn cho ngành chăn nuôi lợn.

Ngoài việc tiêm vaccin, các thuốc kháng sinh cũng thường được sử dụng để kiểm soát và điều trị các bệnh đường hô hấp ở lợn có liên quan tới *H. parasuis* (De la Fuente et al., 2007) và hiện tại nhóm kháng sinh beta-lactam (ampicillin và penicillin), phenicol (florfenicol), macrolides

¹. Phòng Thí nghiệm vi sinh và miễn dịch học chuyên sâu, Đại học Passo Fundo, Brazil

². Khoa Thú y, Đại học León, Tây Ban Nha

(erythromycin, tilmicosin, tylosin tartrate), sulphonamid và tetracycline (chlortetracycline, oxitetracycline và tetracyclin) đang được sử dụng để điều trị bệnh do *H. parasuis* xảy ra tại các trang trại chăn nuôi lợn lớn (Dayao et al., 2014). Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh bừa bãi đã dẫn tới sự phát triển của vi khuẩn kháng thuốc (Aarestrup et al., 2008).

Hiện tượng kháng kháng sinh của các chủng *H. parasuis* đã được nghiên cứu ở Trung Quốc (Zhou et al., 2010), Đan Mạch (Aarestrup et al., 2004), Úc (Dayao et al., 2014), Tây Ban Nha và Vương quốc Anh (De la Fuente et al., 2007). Sự gia tăng liên tục của các chủng kháng kháng sinh gây khó khăn cho việc dự đoán hiệu quả điều trị cho lợn con bị bệnh mà trước đó không thực hiện kiểm tra tính mẫn cảm kháng sinh. Vì vậy, xét nghiệm tính mẫn cảm kháng sinh thường xuyên là rất quan trọng để đảm bảo hiệu quả của các loại kháng sinh khác nhau đối với vi khuẩn *H. parasuis* (Aarestrup et al., 2008).

Brazil là một trong những nước lớn trong ngành chăn nuôi lợn, nhưng có rất ít thông tin về dịch tễ học, tỷ lệ lưu hành huyết thanh và sự mẫn cảm kháng sinh của các chủng *H. parasuis* phân lập được từ các ca bệnh trên lâm sàng. Các vụ dịch GD ở các đàn lợn đã được tiêm phòng và kháng thuốc khi điều trị bằng kháng sinh là vấn đề lớn đối với các bác sĩ thú y điều trị lâm sàng cũng như các chẩn đoán viên. Việc định type các chủng phân lập từ thực địa và thử nghiệm tính mẫn cảm kháng sinh của chúng cho thấy một số ổ dịch GD do các serotype không có trong vacxin thương mại gây ra và chúng kháng với các kháng sinh thường được sử dụng. Vì vậy, mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá tính mẫn cảm kháng sinh của các chủng *H. parasuis* phân lập từ thực địa và chọn ra các loại kháng sinh cũng như nồng độ tương ứng của chúng có thể sử dụng để kiểm soát dịch bệnh GD ở lợn.

II. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Các chủng *Haemophilus parasuis* chuẩn và chủng phân lập

15 chủng *H. parasuis* chuẩn (N^o4, SW140, SW114, SW124, Nagasaki, 131, 174, C5, D74,

H555, H465, H425, 84-17975, 84-22113 và 84-15995) đã được sử dụng.

Vi khuẩn được nuôi cấy trong môi trường PPLO (Himedia, Ấn Độ) có bổ sung 2,5mg/ml glucose (Sigma-Aldrich, Đức) và 75mg/ml nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) (Sigma-Aldrich); nuôi lắc trong 24-36h (250rpm, New Brunswick, Đức) ở 37°C trong điều kiện có 5% CO₂.

Ngoài ra, 50 chủng phân lập được từ năm 2012 đến 2014 được chọn ngẫu nhiên từ bộ giống vi khuẩn của Phòng thí nghiệm Vi sinh và Miễn dịch học, Đại học Fundoade Passo, Passo Fundo, RS, Brazil. Tất cả các chủng đều được phân lập từ những lợn bị viêm màng bao tim có fibrin và được nuôi cấy trong PPLO broth có bổ trợ như mô tả ở trên. Các mẫu bệnh phẩm đều được thu thập từ các trang trại ở khu vực phía Bắc của Rio Grande do Sul (20 chủng), phía Tây Santa Catarina (15 chủng) và phía Tây Nam của Paraná (15 chủng).

2.2. Xác định serotype các chủng phân lập được

Các chủng phân lập được định type bằng phương pháp PCR đa môi được thiết kế bởi Howell và cs. (2015).

Phương pháp ngưng kết hồng cầu gián tiếp sử dụng hồng cầu cừu đã được xử lý bằng acid tannic (Lorenson và cs., 2016) được sử dụng để phân biệt giữa serovar (SV) 5 và SV 12.

2.3. Chuẩn bị đĩa kháng sinh

Các dung dịch kháng sinh được pha loãng trong PPLO theo hướng dẫn của Viện Tiêu chuẩn lâm sàng và phòng thí nghiệm (CLSI, 2013) hoặc được sử dụng ở các nồng độ sau: ampicillin (AMP; 0,12-16mg/ml); bacitracin (BAC; 1-64mg/ml); cephalotin (CF; 1-32mg/ml); chlortetracycline (CTET; 0,25-8mg/ml); clindamycin (CLI; 0,25-16mg/ml); danofloxacin (DANO; 0,12-4mg/ml); enrofloxacin (ENRO; 0,12-4mg/ml); erythromycin (ERY; 0,25-64mg/ml); florfenicol (FFC; 0,12-8mg/ml); gentamicin (GEN; 0,5-8mg/ml); kanamycin (KAN; 0,5-2mg/ml); lincomycin (LCM; 0,12-1mg/ml); neomycin (NEO; 0,5-32mg/ml); oxytetracyclin (OXY; 0,25-16mg/ml); penicillin (PEN; 0,12-8mg/ml); spectinomycin sulfate (SPE; 2-64mg/ml); trimethoprim:sulfamethoxazole (SXT;

0,5:9,5-2:38mg/ml); tetracyclin (TCN; 0,12-64mg/ml); tiamulin (TIA; 0,25-32mg/ml); tilmicosin (TIL; 0,5-32mg/ml); tylosin tartrate (TYLT; 1-64mg/ml).

Tất cả các loại kháng sinh (dạng bột nguyên chất) đều được mua từ hãng Sigma-Aldrich, ngoại trừ ampicillin (Roche, Thụy Sĩ). Gentamicin được mua ở dạng dung dịch chuẩn từ hãng Gibco, CA.

2.4. Phương pháp xác định MIC

Canh trùng *H. parasuis* (nuôi trong PPLO có bổ trợ) được điều chỉnh đến giá trị OD 0,15 (A600nm) (10^8 vi khuẩn/ml, tương đương 0,5 MacFarland). Nồng độ vi khuẩn được sử dụng trong thí nghiệm này là 5×10^6 vi khuẩn/giếng. Kháng sinh được pha loãng theo cơ số 2 từ một

nồng độ nhất định. Vi khuẩn được bổ sung vào các giếng đã chứa các loại kháng sinh và ủ trong 24-36h có lắc (200 rpm, New Brunswick) ở 37°C, trong điều kiện 5% CO₂. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) được xác định là nồng độ thấp nhất của thuốc kháng sinh không phát hiện thấy sự phát triển của vi khuẩn bằng mắt thường (CLSI, 2013). Chủng *Actinobacillus pleuropneumoniae* ATCC 27090 được sử dụng làm chủng đối chứng. Mỗi chủng phân lập được kiểm tra 2 lần.

III. KẾT QUẢ

Kết quả kiểm tra tính mẫn cảm và các giá trị MIC, MIC₅₀ và MIC₉₀ của 15 chủng *H. parasuis* chuẩn được thể hiện trong bảng 1.

Bảng 1. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các loại kháng sinh đối với 15 chủng *Haemophilus parasuis* tham chiếu

Loại kháng sinh	Khoảng chuẩn (µg/ml)	Số chủng tham chiếu với MIC (µg/ml)												MIC ₅₀	MIC ₉₀
		0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64			
Ampicillin (AMP)	0,12-16	11	3	1									0,12	0,25	
Bacitracin (BAC)	1-64											15	>64	>64	
Cephalothin (CF)	1-32				14	1							1	1	
Chlortetracycline (CTET)	0,25-8		7		4	3	1						1	2	
Clindamycin (CLI)	0,25-16		11	2					2				0,25	0,5	
Danofloxacin (DANO)	0,12-4	14		1									0,12	0,12	
Enrofloxacin (ENRO)	0,12-4	15											0,12	0,12	
Erythromycin (ERY)	0,25-64		8	5	1	1							0,25	1	
Florfenicol (FFC)	0,12-8				6	6	1	1				1	2	8	
Gentamicin (GEN)	0,5-8							1				14	>64	>64	
Kanamycin	0,5-2			12		3							0,5	2	
Lincomycin (LCM)	0,12-1	6	3	3	2							1	0,25	1	
Neomycin (NEO)	0,5-32			2	2	4	5	2					2	8	
Oxytetracycline (OXY)	0,25-16		13	2									0,5	0,5	
Penicillin (PEN)	0,12-8	15											0,12	0,12	
Spectinomycin (SPE)	2-64					8	4	3					2	8	
SXT	0,5-2			15									0,5	0,5	
Tetracyclin (TCN)	0,12-64	14		1									0,12	0,12	
Tiamulin (TIA)	0,25-32		1		1	1	4	3	2	3			8	32	
Tilmicosin (TIL)	0,5-32			14		1							0,5	0,5	
Tylosin tartrate (TYLT)	1-64				2	1	8	4					4	8	

Ghi chú: MIC₅₀ và MIC₉₀: nồng độ ức chế tối thiểu của một loại kháng sinh có thể ức chế sự phát triển của 50% và 90% số chủng. Khoảng chuẩn: nồng độ sử dụng của mỗi loại kháng sinh. SXT: trimethoprim/sulphamethoxazole tỷ lệ 1:19.

Tất cả chúng đều mẫn cảm ở nồng độ $\leq 0,12\text{mg/ml}$ ENRO và PEN, và 14 trong số 15 chủng (93,3%) mẫn cảm DANO và TCN. Tất cả các chủng này đều mẫn cảm với khoảng nồng độ kháng sinh kiểm tra, ngoại trừ BAC và GEN, trong đó tất cả hoặc 14 trong số 15 chủng (93,3%) đều kháng. Trước khi kiểm tra, 50 chủng phân lập được đều được xác định serotype. Serovar (SV) 4 là phổ biến nhất (24%), tiếp đến là SV 5 (20%), SV 1 (14%), SV 12 (14%) và SV14 (12%). SV 2 chỉ được phát hiện ở hai chủng phân lập trong khi 12% các chủng phân

lập từ các ca bệnh lâm sàng không thể định type được. Một số trong 50 chủng phân lập được thử nghiệm ở mức độ nào đó có khả năng kháng lại nồng độ kháng sinh được sử dụng (bảng 2). 88% và 82% các chủng kháng ($\text{MIC}_{50} > 64\text{mg/ml}$) với BAC và GEN tương ứng; 42% trong số đó có khả năng đề kháng với 64 mg/ml LCM ($\text{MIC}_{50} = 0,5\text{mg/ml}$) và 48% có khả năng kháng lại TIA ($\text{MIC}_{50} = 8\text{mg/ml}$). Ngoại trừ NEO, các chủng phân lập được đều có thể phát triển trong các môi trường có các loại kháng sinh còn lại ở nồng độ $> 64\text{mg/ml}$ (bảng 2).

Bảng 2. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của các loại kháng sinh đối với 50 chủng *Haemophilus parasuis* phân lập được

Loại kháng sinh	Khoảng chuẩn ($\mu\text{g/ml}$)	Số chủng tham chiếu với MIC ($\mu\text{g/ml}$)											MIC_{50}	MIC_{90}
		0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	>64		
Ampicillin (AMP)	0,12-16	11	3	9	10	12	2					3	1	4
Bacitracin (BAC)	1-64				2				2		2	44	>64	>64
Cephalothin (CF)	1-32				32	3	2	2	2	3		6	1	>64
Chlortetracycline (CTET)	0,25-8		17	2	7	6	6	4				8	1	>64
Clindamycin (CLI)	0,25-16		36	5	5							3	0,25	1
Danofloxacin (DANO)	0,12-4	33	2		6	5	2					2	0,12	0,12
Enrofloxacin (ENRO)	0,12-4	44	1	2	1	1						1	0,12	0,25
Erythromycin (ERY)	0,25-64		21	2	5	3	4	4	5	2		4	1	32
Florfenicol (FFC)	0,12-8	4	1		6	7	20	3				9	4	>64
Gentamicin (GEN)	0,5-8			1		2	4	2				41	>64	>64
Kanamycin	0,5-2			43	5							2	0,5	1
Lincomycin (LCM)	0,12-1	15	6	4	4							21	0,5	>64
Neomycin (NEO)	0,5-32			16	4	10	10	5	4	1			2	8
Oxytetracycline (OXY)	0,25-16		17	6	9	5	2	4	1			6	1	>64
Penicillin (PEN)	0,12-8	17	8	5	5	5		4	1			5	0,25	16
Spectinomycin (SPE)	2-64					26	4	6	7		4	3	2	64
SXT	0,5-2			24	7	11						8	1	>64
Tetracyclin (TCN)	0,12-64	24	5	4	5	4	3	2	1	1		1	0,25	8
Tiamulin (TIA)	0,25-32		5		1	7	8	5	10	2		12	8	>64
Tilmicosin (TIL)	0,5-32			30	1	5	2	4	2			6	0,5	>64
Tylosin tartrate (TYLT)	1-64				6	4	3	6	12	8	1	10	16	>64

Ghi chú: MIC_{50} và MIC_{90} : nồng độ ức chế tối thiểu của một loại kháng sinh có thể ức chế sự phát triển của 50% và 90% số chủng. Khoảng chuẩn: nồng độ sử dụng của mỗi loại kháng sinh. SXT: trimethoprim/sulphamethoxazole tỷ lệ 1:19.

MIC của các chủng phân lập được thuộc cùng một serovar đã được so sánh (bảng 3). Các chủng thuộc cùng một serovar có cùng sự mẫn cảm; tuy nhiên, các serovar khác nhau có sự mẫn cảm khác nhau, ngoại trừ chúng đều kháng mạnh với BAC và GEN.

Cụ thể, tất cả các chủng phân lập thuộc SV 2, SV 5, SV 11 và SV 12 mẫn cảm với CLI ($\text{MIC}_{50} = 0,25\text{mg/ml}$) trong khi đó SV 15 có sự kháng thuốc khác nhau. Đáng chú ý là SV 12 kháng nhiều nhất với LCM ($\text{MIC}_{90} > 64\text{mg/ml}$) so với các serovar khác chỉ kháng

thuốc ở mức trung bình. Các chủng không định type được không giống nhau về tính mẫn cảm với kháng

sinh. Tuy nhiên, chúng nhạy cảm với ENRO ($MIC_{90} = 0,5\text{mg/ml}$) và tất cả đều kháng BAC (bảng 3).

Bảng 3. Sự mẫn cảm kháng sinh của các chủng phân lập theo serovar

Serovar	Sự mẫn cảm với kháng sinh	
	Mẫn cảm cao	Kháng mạnh
SV 1	CLIN, KAN	BAC, GEN
SV 2	CTET, CLI, ENRO, NEO, PEN	BAC
SV 4	DANO, ENRO, KAN	BAC, GEN
SV 5	CF, CLI, ENRO	BAC, GEN
SV 12	ENRO, KAN	BAC, GEN
SV 14	CF, CLI, ENRO, KAN, SPE	BAC, GEN
NT	ENRO, KAN	BAC, GEN

Ghi chú: Sự mẫn cảm kháng sinh của các chủng phân lập được so sánh theo từng serovar. Loại kháng sinh được chia thành hiệu quả cao ($MIC_{90} \leq 0,5\mu\text{g/ml}$) hoặc không hiệu quả ($MIC_{90} > 64\mu\text{g/ml}$). NT: Không định type được. BAC: bacitracin, CLI: clindamycin, CF: cephalothin, CTET: chlortetracycline, DANO: danofloxacin, ENRO: enrofloxacin, GEN: gentamicin, KAN: kanamycin, NEO: neomycin, SPE: spectinomycin.

IV. THẢO LUẬN

Quá trình của bệnh GD thường ngắn và nhiều lợn con bị bệnh sẽ chết nếu không được điều trị. *H. parasuis* mẫn cảm với nhiều kháng sinh, nhưng tính mẫn cảm của các chủng phân lập có thể thay đổi theo thời gian. Vì vậy, việc đánh giá sự mẫn cảm của các chủng phân lập với các kháng sinh thường được sử dụng là rất cần thiết để đưa ra được liệu trình điều trị thích hợp. Tất cả các kháng sinh được thử nghiệm trong nghiên cứu này đều được sử dụng ở Brazil, ngoại trừ spectinomycin. Các kháng sinh thuộc họ fluoroquinolone (DANO và ENRO) được phát triển để sử dụng trong thú y (Lopez-Cadenas và cs., 2013; Shojaee Aliabadi và Lees, 2003) và có hiệu quả nhất (MIC_{90} lần lượt là 0,12 và 0,25 mg/ml). Một số chủng phân lập được tại Anh và Thụy Sĩ không kháng với ENRO đã được báo cáo (De la Fuente et al., 2007; Wissing et al., 2001).

Tuy nhiên, một nghiên cứu khác đã được thực hiện ở Tây Ban Nha và phía Nam Trung Quốc công bố 20% và 70,9% các chủng phân lập lần lượt kháng với ENRO và DANO (De la Fuente et al., 2007; Zhou et al., 2010). Theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi, DANO và ENRO là 2 loại kháng sinh hiệu quả nhất trong điều trị bệnh do *H.*

parasuis ở lợn con. Trong một nghiên cứu trước đây, (Cheng et al., 2012) đã công bố rằng hiệu quả của kháng sinh thuộc nhóm fluoroquinolone trong điều trị là kết quả của chính sách quản lý kháng sinh. Khả dụng sinh học của kháng sinh phụ thuộc rất lớn vào quản lý hành chính, loài vật và tình trạng sinh lý của chúng (Lopez-Cadenas et al., 2013). Cần cẩn trọng khi điều trị bằng fluoroquinolone vì một số tác dụng phụ, bao gồm viêm gân và các tác động liên quan đến hệ thần kinh trung ương, đã được ghi nhận ở người (Owens và Ambrose, 2005). Ngoài ra, một số cơ chế kháng fluoroquinolone gây ra đã được xác định: đột biến gen topoisomerase II và IV, phản ứng quá mức của cơ chế bơm, giảm sự hoạt hóa của vách tế bào và làm thay đổi các yếu tố được cho là độc lực của vi khuẩn (Jacoby và cs., 2013; Zhang và cs., 2013).

Khả năng kháng với fluoroquinolone đã được ghi nhận ở các chủng phân lập từ các ca bệnh và môi trường, và khả năng này dường như đang lan rộng (Jacoby và cs., 2013; Piddock, 1999), do đó cần phải sử dụng nhóm kháng sinh này một cách cẩn thận và có chiến lược để hạn chế sự gia tăng các chủng kháng thuốc.

Đối với các kháng sinh nhóm aminoglycoside, kết quả rất khác nhau tùy theo kháng sinh được thử nghiệm. Cụ thể, vi khuẩn này có tỷ lệ mẫn

cảm cao với KAN nhưng có tỷ lệ kháng cao với GEN. Lý do có sự khác nhau này vẫn chưa được giải thích rõ ràng. Mục tiêu của kháng sinh nhóm aminoglycosides chủ yếu nhắm vào ribosome, nhưng cũng còn nhiều cơ chế sinh học khác (Davies và Wright, 1997). Một số cơ chế có thể làm giảm hoạt động của aminoglycosides như giảm sự hấp thụ thuốc hoặc tích tụ trong vi khuẩn và kích hoạt các enzym vi khuẩn làm bất hoạt kháng sinh (Shaw và cs., 1993). Các enzym làm thay đổi aminoglycoside thường được mã hóa trong plasmid, nhưng chúng cũng được kết nối với các yếu tố vận chuyển và tích hợp vào bộ gen (Mingeot-Leclercq et al., 1999). Trong số các enzym này, N-acetyltransferases tạo ra khả năng kháng với GEN nhưng không kháng KAN (Shaw và cs., 1993). Nguyên nhân của hiện tượng này có thể do việc sử dụng GEN rộng rãi hơn trong chăn nuôi lợn tại địa phương đã tạo một chủng có khả năng kháng với GEN, và gen này được mã hóa trong plasmid. Tuy nhiên, khi kiểm tra tính mẫn cảm kháng sinh của các chủng tham chiếu cũng cho kết quả tương tự, cho thấy có lẽ gen (hoặc một số gen) kháng thuốc có thể đã được tích hợp vào hệ gen. Một số aminoglycosides khác có sự mẫn cảm cao, cụ thể là NEO và SPE. Trong nghiên cứu của chúng tôi, MIC₉₀ của SPE (64mg/ml) tương tự như các báo cáo ở Tây Ban Nha, Anh (De la Fuente et al., 2007) và Đan Mạch (Aarestrup et al., 2004) khi nghiên cứu trên các chủng phân lập, trong khi MIC₅₀ thấp hơn (2mg/ml) khi so với những nghiên cứu trước đây.

Quan trọng hơn, trong nghiên cứu này không có chủng phân lập từ thực địa nào nhạy cảm với NEO. Các kết quả thu được khi thí nghiệm với BAC phù hợp với kết quả của các báo cáo khác (Hovig và Aandahl, 1969). Tỷ lệ kháng cao với GEN và BAC ở cả hai nhóm vi khuẩn phân lập và tham chiếu đưa ra gợi ý rằng có thể sử dụng GEN và BAC (ở nồng độ 0,25µg/ml) bổ sung trong môi trường chọn lọc để phân lập *H. parasuis* ở phòng thí nghiệm. Các chủng phân lập mẫn cảm với CLI (MIC₉₀ = 1mg/ml) nhưng kháng với LCM (MIC₉₀ >> 64 mg/ml) - một kháng sinh thuộc nhóm lincosamide.

Ngoài ra, ở Tây Ban Nha, khi nghiên cứu trên cùng một mô hình với các chủng phân lập thực địa đều thu được kết quả về sự mẫn cảm với LCM

tương tự như nhau (De la Fuente et al., 2007), cho thấy một quá trình liên tục của sự kháng thuốc.

Tương tự khi nghiên cứu với CF, AMP và PEN (các kháng sinh thuộc nhóm beta-lactam), cho thấy có sự phát triển về mức độ kháng thuốc nhất định. Trong các nghiên cứu khác (Wissing et al., 2001; Aarestrup và cs., 2004; Zhou và cs., 2010; Nedbalcova và Kucerova, 2013), sự mẫn cảm với beta-lactam thay đổi từ mẫn cảm cao với PEN ở các chủng phân lập ở Anh (De la Fuente et al., 2007) đến tính kháng ngày càng cao với AMP ở các chủng phân lập ở Tây Ban Nha (De la Fuente et al., 2007; San Millan et al., 2007). Khả năng kháng với ERY và TIL của các chủng phân lập ở Brazil (lần lượt là 30% và 16%) thấp hơn so với 40% các chủng phân lập ở Tây Ban Nha (De la Fuente et al., 2007). Tuy nhiên, các chủng phân lập từ thực địa tại Anh (De la Fuente et al., 2007), Đan Mạch (Aarestrup et al., 2004) và Trung Quốc (Zhou et al., 2010) cho thấy rất ít hoặc không có khả năng kháng với ERY và TIL, trong khi các chủng phân lập ở Cộng hòa Séc có khả năng kháng ERY cao (Nedbalcova et al., 2006) nhưng không kháng TIL (Nedbalcova và Kucerova, 2013). Không phát hiện điểm ngưỡng cho TYLT. Tuy nhiên, giá trị MIC₅₀ và MIC₉₀ là tương đối cao ở các chủng phân lập ở Brazil (lần lượt là 16 và > 64mg/ml) cho thấy sự tồn tại của các chủng kháng TYLT. Các chủng phân lập tại Tây Ban Nha có khả năng kháng OXY cao nhất (De la Fuente et al., 2007), tiếp theo là các chủng phân lập trong nghiên cứu này (có sự đề kháng ở mức trung bình) (Aarestrup và cs., 2004, De la Fuente et al., 2007). Sự mẫn cảm với TCN của các chủng phân lập ở Brazil phù hợp với báo cáo ở Cộng hòa Séc (Nedbalcova và Kucerova, 2013).

Tất cả các chủng phân lập từ các nghiên cứu trước đây (Aarestrup và cs., 2004; De la Fuente và cs., 2007; Zhou et al., 2010; Nedbalcova và Kucerova, 2013) đều không kháng với FFC. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, 24% số chủng phân lập được kháng với FFC, và 20 chủng phân lập khác phải sử dụng liều cao trước điểm ngưỡng (4mg/ml), cho thấy nguy cơ xuất hiện chủng *H. parasuis* kháng loại kháng sinh này. Một quan sát tương tự đã được thực hiện với SXT, trong đó 24 chủng phân lập phải sử dụng kháng sinh ở nồng độ ngay gần điểm ngưỡng (0,5mg/ml). Sự

kháng kháng sinh này ngày càng tăng đã được ghi nhận ở Đan Mạch (Aarestrup et al., 2004), Anh (De la Fuente et al., 2007), Trung Quốc (Zhou et al., 2010) và đặc biệt là các chủng phân lập ở Tây Ban Nha với 53,3% số chủng kháng (De la Fuente et al., 2007). Tuy nhiên, các chủng phân lập ở Cộng hòa Séc không kháng loại kháng sinh này (Nedbalcova và Kucerova, 2013).

Cuối cùng, chúng tôi nhận thấy tính kháng cao (48%) đối với TIA, tương tự như ở các chủng phân lập tại Tây Ban Nha trong khi các chủng ở Anh và Cộng hòa Séc miễn cảm (De la Fuente et al., 2007; Nedbalcova và Kucerova, 2013).

Theo kết quả của chúng tôi, các kháng sinh có thể được chia thành 3 nhóm: a) nhóm “hiệu quả thấp” bao gồm BAC, GEN, LCM và TIA; b) nhóm “hiệu quả cao” bao gồm AMP, CLI, DANO, ENRO, NEO và PEN (tỷ lệ kháng từ 0 đến 10%), và do đó được khuyến cáo sử dụng trong điều trị bệnh do *H. parasuis* ở Brazil; và c) nhóm “trung gian” gồm 11 loại kháng sinh còn lại được sử dụng trong nghiên cứu này (các chủng phân lập từ thực địa có tỷ lệ kháng trung bình, từ 11-40%). Các kháng sinh hiện đang được sử dụng để kiểm soát và điều trị dịch bệnh do *H. parasuis* ở lợn là beta-lactams (AMP và PEN), phenicols (FFC), macrolide (ERY, TIL, TYLT), sulphonamides (SXT) và tetracycline (CTET, OXY và TCN) (Dayao et al., 2014).

Theo kết quả nghiên cứu của chúng tôi, tất cả các kháng sinh được sử dụng để điều trị bệnh GD đều thuộc nhóm trung gian, ngoại trừ PEN. Tính kháng trung bình này có thể là do sự hiện diện và lan rộng của các gen kháng trong plasmid của *H. parasuis*, như đã được báo cáo với tetracycline và beta-lactams (Lancashire et al., 2005; San Millan et al., 2007), hoặc bằng các cơ chế khác chưa được xác định.

V. KẾT LUẬN

Sự miễn cảm của các chủng *Haemophilus parasuis* phân lập từ các trại chăn nuôi lợn ở Nam Brazil cho thấy rằng chúng có mức độ kháng khác nhau với các loại kháng sinh. Có lẽ, việc sử dụng một số kháng sinh ưu tiên trong các vụ dịch GD ở lợn đã tạo ra một số chủng kháng với các hợp chất này.

Các chủng *H. parasuis* tham chiếu có cùng đặc tính miễn cảm với kháng sinh. Quan sát này có thể chỉ ra rằng sức đề kháng thu được đối với một số loại kháng sinh có thể được thực hiện bởi transposon và do đó được tích hợp trong hệ gen.

Kết quả của chúng tôi cho thấy tầm quan trọng của việc sử dụng một cách cẩn trọng các loại kháng sinh để điều trị GD nhằm tránh sự phát triển của các chủng kháng thuốc mới. Vì lý do này, một cuộc khảo sát định kỳ nên được tiến hành để kiểm soát tiến triển của tính kháng kháng sinh ở vi khuẩn *H. parasuis*.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ Chương trình tư vấn quốc gia về phát triển khoa học và công nghệ Brazil (CNPq, mã dự án 485807/2013-0). M.M và J.A.G đã nhận được học bổng sau tiến sỹ từ Chương trình phối hợp nhằm cải thiện năng lực cá nhân (CAPEs). M.S.L và J.P.E đã nhận được học bổng Thạc sỹ từ quỹ của trường Đại học Passo Fundo.

Xung đột lợi ích: Các tác giả khẳng định họ không có bất kỳ xung đột nào về lợi ích.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Aarestrup F.M., Oliver Duran C. & Burch D.G. 2008. Hiện tượng kháng kháng sinh trong các sản phẩm từ lợn. *Anim. Health Res. Rev.* 9:135-148.
2. Aarestrup F.M., Seyfarth A.M. & Angen O. 2004. Tính miễn cảm kháng sinh của *Haemophilus parasuis* và *Histophilus somni* phân lập từ lợn và trâu bò ở Đan Mạch. *Vet. Microbiol.* 101:143-146.
3. Cheng A.C., Turnidge J., Collignon P., Looke D., Barton M. & Gottlieb T. 2012. Kiểm soát hiện tượng kháng fluoroquinolone thông qua thành công của các quy tắc ở Úc. *Emerg. Infect. Dis.* 18:1453-1460.
4. CLSI 2013. Quy tắc kiểm tra tính miễn cảm kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán trên thạch và pha loãng cho các vi khuẩn phân lập từ động vật, tái bản lần thứ 4. *CLSI Document VET01-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.* Costa-Hurtado M. & Aragon V. 2013. Những tiến bộ trong phát hiện các yếu tố độc lực của *Haemophilus parasuis*. *Vet. J.* 198:571-576.
5. Davies J. & Wright G.D. 1997. Vi khuẩn kháng kháng sinh nhóm aminoglycoside. *Trends Microbiol.* 5:234-240.

6. Dayao D.A., Kienzle M., Gibson J.S., Blackall P.J. & Turni C. 2014. Ứng dụng phương pháp thử nghiệm kiểm tra tính miễn cảm kháng sinh của *Haemophilus parasuis*. *Vet. Microbiol.* 172:586-589.
7. De la Fuente A.J., Tucker A.W., Navas J., Blanco M., Morris S.J. & Gutierrez-Martin C.B. 2007. Đặc điểm miễn cảm kháng sinh của *Haemophilus parasuis* phân lập từ lợn ở Vương quốc Anh và Tây Ban Nha. *Vet. Microbiol.* 120:184-191.
8. Hovig B. & Aandahl E.H. 1969. Phương pháp phân lập chọn lọc vi khuẩn *Haemophilus* từ mẫu bệnh phẩm thu thập từ đường hô hấp. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 77:676-684.
- Howell K.J., Peters S.E., Wang J., Hernandez-Garcia J., Weinert L.A., Luan S.L., Chaudhuri R.R., Angen O., Aragon V., Williamson S.M., Parkhill J., Langford P.R., Rycroft A.N., Wren B.W., Maskell D.J., Tucker A.W. & Consortium B.R.T. 2015. Xây dựng quy trình PCR đa mục đích để xác định nhanh serotype của vi khuẩn *Haemophilus parasuis*. *J. Clin. Microbiol.* 53:3812-3821.
9. Jacoby G.A., Corcoran M.A., Mills D.M., Griffin C.M. & Hooper D.C. 2013. Phân tích đột biến của protein QnrB1 quy định tính kháng quinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:5733-5736.
10. Lancashire J.F., Terry T.D., Blackall P.J. & Jennings M.P. 2005. Gen kháng tetracycline TetB mã hóa trên plasmid ở vi khuẩn *Haemophilus parasuis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:1927-1931.
11. Lorenson M.S., Miani M., Guizzo J.A., Barasuol B., Martínez-Martínez S., Ferri E.F.R., Gutiérrez Martín C.B., Kreutz L.C. & Frandoloso R. 2016. Cải tiến phương pháp ngưng kết hồng cầu gián tiếp để xác định serotype của *Haemophilus parasuis*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 69:15-21.
12. Lopez-Cadenas C., Sierra-Vega M., Garcia-Vieitez J.J., Diez-Liebana M.J., Sahagun-Prieto A. & Fernandez-Martinez N. 2013. Enrofloxacin: được động học và chuyển hóa ở các loài vật nuôi. *Curr. Drug Metab.* 14:1042-1058
13. Mingeot-Leclercq M.P., Glupczynski Y. & Tulkens P.M. 1999. Aminoglycosides: hoạt hóa và kháng. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:727-737.
14. Nedbalcova K. & Kucerova Z. 2013. Tính miễn cảm kháng sinh của *Pasteurella multocida* và *Haemophilus parasuis* phân lập từ lợn mắc bệnh phổi. *Acta Veterinaria Brno* 82:3-7.
15. Nedbalcova K., Satran P., Jaglic Z., Ondriasova R. & Kucerova Z. 2006. *Haemophilus parasuis* và bệnh Glasser ở lợn. *Veterinarni Medicina* 51:168-179.
- Oliveira S., Galina L. & Pijoan C. 2001. Xây dựng quy trình PCR chẩn đoán bệnh do nhiễm *Haemophilus parasuis*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13:495-501.
16. Owens Jr R.C. & Ambrose P.G. 2005. Sử dụng kháng sinh an toàn: tập trung vào nhóm fluoroquinolone. *Clin. Infect. Dis.* 41(Suppl.2):S144-157.
17. Piddock L.J. 1999. Cơ chế kháng fluoroquinolone: cập nhật từ 1994-1998. *Drugs* 58(Suppl.2):11-18.
18. Rafiee M. & Blackall P.J. 2000. Xây dựng, đánh giá và ứng dụng quy trình Kielstein-Rapp-Gabrielson để xác định serotype của *Haemophilus parasuis*. *Aust. Vet. J.* 78:172-174.
19. San Millan A., Escudero J.A., Catalan A., Nieto S., Farelo F., Gibert M., Moreno M.A., Dominguez L. & Gonzalez-Zorn B. 2007. Khả năng kháng beta-lactam của vi khuẩn *Haemophilus parasuis* liên quan tới plasmid pB1000 có mang gen blaROB-1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:2260-2264.
20. Shaw K.J., Rather P.N., Hare R.S. & Miller G.H. 1993. Di truyền phân tử của các gen kháng aminoglycoside và mối quan hệ gần với các enzyme biến đổi aminoglycoside. *Microbiol. Rev.* 57:138-163.
21. Shojae Aliabadi F. & Lees P. 2003. Tương tác dược động học – dược lực học của danofloxacin ở bê. *Res. Vet. Sci.* 74:247-259.
22. Wissing A., Nicolet J. & Boerlin P. 2001. Tình hình kháng kháng sinh trong ngành thú y Thụy Sĩ. *Schweiz. ArchTierheilkd* 143:503-510.
23. Zhang Q., Liu J., Yan S., Yang Y., Zhang A. & Jin M. 2013. *Haemophilus parasuis* kháng fluoroquinolon có nhiều yếu tố độc lực hơn các chủng miễn cảm với kháng sinh này. *J. Clin. Microbiol.* 51:3130-3131.
24. Zhou X., Xu X., Zhao Y., Chen P., Zhang X., Chen H. & Cai X. 2010. Tỷ lệ kháng kháng sinh giữa các serovar khác nhau của các chủng *Haemophilus parasuis* phân lập được. *Vet. Microbiol.* 141:168-173.

Lưu Thị Hải Yến (Viện Thú y) dịch từ "Antimicrobial susceptibility patterns of Brazilian *Haemophilus parasuis* field isolates" *Pesq. Vet. Bras.* 37(11):1187-1192, novembro 2017.